

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2000-515251

(P2000-515251A)

(43) 公表日 平成12年11月14日 (2000. 11. 14)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード* (参考)
G 0 1 N 33/543	5 2 5	G 0 1 N 33/543	5 2 5 U
C 1 2 M 1/00		C 1 2 M 1/00	A
C 1 2 N 15/09		C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/68		G 0 1 N 33/553	
G 0 1 N 33/553		C 1 2 N 15/00	A
		審査請求 有	予備審査請求 有 (全 20 頁)

(21) 出願番号	特願平11-508180	(71) 出願人	アクゾ・ノベル・エヌ・ベー
(86) (22) 出願日	平成10年7月7日 (1998. 7. 7)		オランダ国、エヌ・エル-6824・ベー・エム・アーネム、フエルベルウエヒ・76
(85) 翻訳文提出日	平成11年10月29日 (1999. 10. 29)	(72) 発明者	フアン・ダンメ、ヘンドリック・シーボルト
(86) 国際出願番号	PCT/EP 98/04938		オランダ国、エヌ・エル-5211・エル・ヘー・スヘルトヘンボス、ベタニエストラート・9
(87) 国際公開番号	WO 99/02266	(72) 発明者	クリューウエル、ヘルマヌス・ヨハネス・マリア
(87) 国際公開日	平成11年1月21日 (1999. 1. 21)		オランダ国、エヌ・エル-5481・エル・ウエー・スヘインデル、ビバルデストラート・10
(31) 優先権主張番号	97202140. 6	(74) 代理人	弁理士 川口 義雄 (外2名)
(32) 優先日	平成9年7月11日 (1997. 7. 11)		
(33) 優先権主張国	ヨーロッパ特許庁 (EP)		
(81) 指定国	EP (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), AU, CA, ID, JP, KR, US		

(54) 【発明の名称】 アッセイを実施するためのデバイス、前記デバイスの製造方法及び前記デバイスの製造における膜の使用

(57) 【要約】

本発明は、整列した貫通チャネルを有する支持体を含むアッセイを実施するためのデバイスであって、前記チャネルはサンプル適用表面上に広がっており、サンプル適用表面の少なくとも1区域内のチャネルにはアナライトに結合し得る第1結合物質が設けられている前記デバイスに関する。本発明の目的は、高いチャネル密度及び高い多孔率を有し、異なる第1結合物質を含む高密度アレーをサンプル適用表面に対して適用し支持体を提供することである。特に、本発明の目的は、典型的なマイクロ成形加工技術を使用する必要がなく、支持体表面上への液体分布に対して改良された制御を与える比較的安価な支持体を含むデバイスを提供することである。本発明の上記目的は、多孔質支持体が電気化学的に製造される金属酸化物膜であるデバイスにより達成される。

【特許請求の範囲】

1. 整列した貫通チャネルを有する支持体を含むアッセイを実施するためのデバイスであって、前記チャネルはサンプル適用表面上に広がっており、サンプル適用表面の少なくとも1区域内のチャネルにはアナライトに結合し得る第1結合物質が設けられており、前記支持体は電気化学的に製造された金属酸化物膜であることを特徴とする前記デバイス。

2. 第1結合物質が核酸プローブ、抗体、抗原、レセプター、ハプテン及びレセプターに対するリガンドからなる群から選択されることを特徴とする請求の範囲第1項に記載のデバイス。

3. 第1結合物質が支持体に共有結合していることを特徴とする請求の範囲第1項または第2項に記載のデバイス。

4. 金属酸化物膜が酸化アルミニウムからなることを特徴とする請求の範囲第1項～第3項のいずれかに記載のデバイス。

5. 第1結合物質をその場で合成することを特徴とする請求の範囲第1項～第4項のいずれかに記載のデバイスの製造方法。

6. 第1結合物質を合成するための化合物をインクジェット技術を用いて特定区域に適用することを特徴とする請求の範囲

第5項に記載のデバイスの製造方法。

7. 化合物を静電引力を用いて適用することを特徴とする請求の範囲第6項に記載のデバイスの製造方法。

8. 第1結合物質をインクジェット技術を用いて特定区域に適用することを特徴とする請求の範囲第1項～第4項のいずれかに記載のデバイスの製造方法。

9. 第1結合物質を静電引力を用いて適用することを特徴とする請求の範囲第8項に記載のデバイスの製造方法。

10. プローブベースのアッセイを実施する請求の範囲第1項～第4項のいずれかに記載のデバイスの製造における電気化学的に製造した金属酸化物膜の使用。

11. 請求の範囲第1項～第4項のいずれかに記載のデバイスを含むキットで

あって、更に第1結合物質とアナライト間で結合が生じたかどうかを調べるための検出手段を含むことを特徴とする前記キット。

12. 検出手段が標識を有する第2結合物質を含むことを特徴とする請求の範囲第11項に記載のキット。

13. 標識が発色反応を生起し得るか及び／またはバイオーもしくは化学ーもしくは光ルミネセンスを生じさせ得ることを

特徴とする請求の範囲第12項に記載のキット。

14. サンプル中のアナライトの検出方法であって、

a) サンプルを請求の範囲第1項～第4項のいずれかに記載のデバイスと接触させるステップ、

b) 第1結合物質とアナライトとを結合させるステップ、及び

c) 第1結合物質とアナライトとの間で結合が生じたかを検出するステップを含む前記方法。

15. アナライトが核酸からなることを特徴とする請求の範囲第14項に記載の方法。

16. 核酸がヒト免疫不全ウイルスから誘導され得ることを特徴とする請求の範囲第15項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

アッセイを実施するためのデバイス、前記デバイスの製造方法及び前記デバイスの製造における膜の使用

本発明は、整列した貫通(through-going)チャネルを有する支持体を含むアッセイを実施するためのデバイスであって、前記チャネルはサンプル適用表面上に広がっており、サンプル適用表面の少なくとも1区域内的のチャネルにはアナライトに結合し得る第1結合物質が設けられている前記デバイスに関する。

前記したデバイスは、「ハイブリダイゼーションによる配列決定」用途のために国際特許出願公開第95/11755号明細書に記載されている。前記デバイスは、支持体表面に対して実質的に垂直に整列しているチャネルを有する支持体を含む。3種の支持体が記載されている。第1のタイプの支持体は複数の中空ガラス繊維から構成されている。これは、エッチング可能なコアを有するガラス繊維を積重ね、得られたスタックに平らな端部を設け、前記端部を磨き、前記コアを通常は酸を用いてエッチングすることにより製造される。第2のタイプの支持体は、結晶性シリコンウェハーを電気化学的にエッチングして

製造される。まず、チャネルの位置及びその大きさを標準的な写真平版方法により規定する。続いて、整列したチャネルを電気化学的に形成する。第3のタイプの支持体は、無機支持体を核トラックエッチングして製造される。この方法は、支持体を重いエネルギー充填した粒子に接触させるステップ及び湿式エッチングするステップを含み、これにより支持体表面上にランダムに散乱したチャネルを有する支持体が生ずる。孔密度及び多孔率が高いと、チャネルが融合する機会が多くなる。融合したチャネルは他の非融合チャネルに比して低い流れ抵抗を示す。

上記した3種の支持体はかなり高価である。なぜならば、製造方法が労働集約的であること、及び／または出発材料が高価であり、鋸引きや研磨のような無駄な作業があること、及び／または装置が高価であるからである。加えて、支持体の多孔率は30%及びそれ以上と比較的低い。最高80%のより高い多孔率が達成可能であると言われているが、比較的に低いチャネル密度では、支持体の特定

区域のチャンネルの有効表面積が同等の多孔率であるがより高いチャンネル密度（及びその結果、より狭いチャンネル）を有する支持体に比較して狭いという欠点を伴う。国際特許出願公開第95/11755号明細書に記載され

ているシリコンベース支持体の別の欠点は、支持体が光を通さないことである。従って、前記支持体を支持体中で結合したアナライトの検出のための光学マーカースystemに使用することはできない。周知の光学マーカースystemは、例えば酵素的に生起される発色反応、バイオまたは化学ルミネセンス、または光ルミネセンスに基づく。後者の場合、励起光または放出されるルミネセント光は支持体材料を通過しなければならない。

本発明の目的は、上記した欠点を解消し、高いチャンネル密度及び高い多孔率を有し、サンプル適用表面の単位あたり異なる第1結合物質を含むより高密度アレーを有し得る支持体を提供することである。加えて、前記支持体は可視光をかなり通す。特に、本発明の目的は、典型的なマイクロ成形加工技術を使用する必要がなく、支持体表面上への液体分布に対して改良された制御を与える比較的安価な支持体を含むデバイスを提供することである。

本発明の上記目的は、多孔質支持体が電気化学的に製造される金属酸化物膜であるデバイスにより達成される。

整列した貫通チャンネルを有する金属酸化物膜は、金属シートを電気化学的にエッチングすることにより安価に製造され得る。

考えられる金属として、特にタンタル、チタン及びアルミニウム、2つ以上の金属の合金、並びにドーブド金属及び合金が挙げられる。金属酸化物膜は透過性であり、特に湿った場合でも透過性であるので、各種光学技術を用いるアッセイに使用可能である。前記膜は、十分に制御された直径及び有利な化学表面特性を有する整列したチャンネルを有する。

従って、本発明は、整列した貫通チャンネルを有する支持体を含むアッセイを実施するためのデバイスであって、前記チャンネルはサンプル適用表面上に広がっており、サンプル適用表面の少なくとも1区域内的のチャンネルにはアナライトに結合

し得る第1結合物質が設けられており、前記支持体が電気化学的に製造される金属酸化物膜である前記デバイスに関する。

好ましい実施態様によれば、第1結合物質は、核酸プローブ、抗体、抗原、レセプター、ハプテン及びレセプターに対するリガンドからなる群から選択される。

本発明のデバイスを使用することができるアッセイには、ハイブリダイゼーションによる配列決定、イムノアッセイ、レセプター／リガンドアッセイ等が含まれ得る。

デバイスをDNA配列情報を得るための道具として使用する

場合、各区域が第1結合物質として異なる塩基対配列のオリゴヌクレオチドプローブを含んでいる複数の区域の大アレーを用意する。(部分的に)未知の配列を有するDNAまたはRNA断片を含むサンプルを支持体と接触させると、特異的ハイブリダイゼーションパターンが生じ得、そのパターンからDNA/RNAの配列情報を導き出すことができる。前記した「ハイブリダイゼーションによる配列決定」は当業界で公知である(例えば、Fodor, S. P. A., Science, 251:767-773(1992)及びSouthern, R. M.ら, Nucleic Acids Res., 22:1368-1373(1994)参照)。

本発明のデバイスは、血液のような生物学的サンプルを多数のアナライトについてスクリーニングするために使用することもできる。前記アレーは、例えば大腸菌、黄色ブドウ球菌等に対して特異的なオリゴヌクレオチドプローブを含む複数の区域から構成され得る。生物学的サンプルは、EP 0 389 063に記載されているように調製され得る。このサンプルを支持体と接触させて生じるハイブリダイゼーションパターンは、例えばCCDカメラと適当な光学マーカを組合わせて読みとるこ

とができる。

細菌のスクリーニング以外に、本発明のデバイスは、ウィルスの検出、並びに

例えばH I Vウイルス、H C Vウイルス等の異なるサブタイプの分類のために適している。ウイルス分類は、可能性ある薬剤耐性を調べるために必要であり得る。一般的に、ウイルス分類ではウイルスRNA中の一点突然変異を検出しなければならない。

本発明のデバイスは、サンドイッチイムノアッセイを実施するためにも適している。この場合、第2抗体を結合アナライトに結合させるために使用することが好ましく、各アナライトに対する第2抗体は第3の標識抗体により認識される。これは、第2及び第3抗体を異なる種から誘導し、第3抗体を他の種の抗体に対して作成することにより達成され得る。従って、各特定アナライトに対する第2抗体を標識することは避ける。

本発明のデバイスは、Geysenら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:3998-4002 (1984)に記載されている「ペプスキャン(pepsans)」を実施するためにも適している。この場合、支持体の異なる区域に結合される第1結合物質はアミノ酸の異なる配列から構成される。特定ア

ナライトを含む液体を支持体と接触させると、異なるアミノ酸配列に対するアナライトの特異的親和性を示す反応パターンが生じ得る。

第1結合物質が支持体に共有結合していることが好ましい。これにより、支持体からの第1結合物質の損失が最小限となる。有機化合物の金属酸化物への共有結合は当業界で公知であり、例えばChu C. W. ら(J. Adhesion Sci. Technol., 7, pp. 417-433 (1993))及びFadda, M. B. ら(Biotechnology and Applied Biochemistry, 16, pp. 221-227 (1992))に記載されている方法を用いて実施される。

好ましい実施態様によれば、金属酸化物膜は酸化アルミニウムからなる。

前記した酸化アルミニウム膜は、膜表面に比較して親水性の貫通チャネルを有していると見られる。よって、親水性液体は膜表面上に広がる代わりにチャネルに進入することが好ましく、有利である。従って、酸化アルミニウム膜は、異なる第1結合物質を含む区域の高濃度に適合し得る。整列した貫通孔を有す

る酸化アルミニウム膜は、R i g b y, W. R. ら (T r a n s. I n s t. M e t a l F i n i s h., 68 (3), p. 95 (1990)) に記載されており、英国オックスフォードシャーに所在の A n o t e c S e p a r a t i o n s L t d. から販売されている。これらの膜はウィルスを精製するため、センサー目的で酵素を保存するために使用されてきたが、プローブベースのアクセシを実施するための支持体としての適性については示唆されていない。

本発明はまた、本発明の整列した貫通孔を有する膜を含むデバイスの製造方法に関し、この方法では第1結合物質をその場で合成する。

例えば、限定数の試薬を用いるのみで、第1結合物質としてオリゴヌクレオチド、通常4つのヌクレオチド化合物 (DNA に対しては d A、d T、d C 及び d G、RNA に対して A、U、C 及び G) 及び追加の試薬、例えばブロック試薬及び保護試薬を含むデバイスのためには、古典的固相合成方法を用いてオリゴヌクレオチドプローブを含む1つの区域または複数の区域のアレーを有する支持体が提供され得る。試薬は、有利にはインクジェット技術を用いて特定区域の貫通チャンネルに適用され得

る。インクジェット技術により、一定量の液体を正確に付着させることができる。平らな非孔質支持体上にオリゴヌクレオチドプローブをその場で合成することは当業界で公知である (例えば、T. P. T h e r i a u l t, “新規な化学ジェットテクノロジーに基づくDNA診断システム (DNA diagnostic systems based on novel Chem-Jet technology)”, 1995年5月10日にワシントン・デュー・シーで開催されたバイオチップアレーテクノロジーに関するIBC会議参照)。

好ましい実施態様によれば、ヌクレオチド化合物を静電引力を用いて適用する。静電引力により、はね散る (splattering) 危険が減少する。

本発明の貫通チャンネルを含むデバイスの代替製造方法によれば、第1結合物質を特定区域の貫通チャンネルにインクジェット技術を用いて適用し得る。これにより、支持体を適用する前に、例えばその配列を証明するためのオリゴヌクレオチドプローブの場合には第1結合物質を精製し得る。

上記した理由により、第1結合物質を静電引力を用いて適用するときには好ましい。

本発明はまた、電気化学的に製造した金属酸化物膜、好まし

くは酸化アルミニウム膜の上記デバイスの製造における使用に関する。

好ましい実施態様によれば、膜の異なる位置で異なるハイブリダイゼーション条件が生ずるようにアッセイの実施中膜上の別々の位置間の温度差を調節する。

前記使用は、有利には核酸ハイブリダイゼーションアッセイまたは免疫学的アッセイを含む。前記アッセイでは、アナライトを含むサンプルを本発明のデバイスと接触させる。その後、アナライトを支持体に結合している第1結合物質に結合させ得る。前記結合は、アナライトを多孔質支持体の中を移動させることによりかなり促進される。結合は、標識に結合させた第2結合物質を添加し、前記第2結合物質を第1結合物質とアナライトとの複合体に結合させ、第1結合物質が固定化されている位置に標識が存在するかを調べることにより検出され得る。或いは、アナライトを前もって標識し、その場合には第1結合物質への結合を第2結合物質を添加せずに直接検出することができる。

本発明はまた、上記デバイスを含むキットに関し、前記キットは更に第1結合物質とアナライト間で結合が生じているかを調べるための検出手段をも含む。好ましくは、前記検出手段は

標識を有する第2結合物質であり得る。好ましくは、標識は発色反応を生起させ得るか及び／またはバイオーまたは化学ルミネセンスを生じ得る。

本発明はまた、サンプル中のアナライトの検出方法に関し、前記方法は、

- a) サンプルを上記デバイスと接触させるステップ、
- b) 第1結合物質とアナライトを結合させるステップ、及び
- c) 第1結合物質とアナライトとの間で結合が起こったかを検出するステップを含む。この方法において、アナライトは核酸プローブ、抗体、抗原、レセプター、ハプテン及びレセプターに対するリガンドであり得る。

本発明を下記実施例により説明する。

実施例 1

2種の型のHIV-1増幅物、すなわち野生型RNA (WT) 及びキャリブレターRNA (Qa) の流動セル中に酸化アルミニウム膜を使用する同時検出アナライト

WT-RNA断片及びQa-RNA断片はHIV-1ゲノム

のGAG領域からの一部を表す。これらの断片は等しい長さ(145nt)を有し、断片の中央部分の21nt長さ領域を除いて同一の配列を有する。前記断片の配列は、

WT-RNA

5'ccugcuaugucacuuccccuugguucucucaucuggccuggug
caauaggcccugcaugcacuggaugcacucuauccccauucugcag
cuuccucauugauggucucuuuuuacauuugcauggcugcuugau
guccccccacu3' (配列番号1)

Qa-RNA

5'ccugcuaugucacuuccccuugguucucucaucuggccuggug
caauaggcccugcaugcgcagucacucuaucuaccacugucugcag
cuuccucauugauggucucuuuuuacauuugcauggcugcuuga
ugccccccacu3' (配列番号2)

WT及びQa特異的部分の配列には下線を付した。

本実施例では、2つの緩衝溶液を使用した。すなわち、8g/lのNaClを含有するpH7.4のリン酸緩衝液(インキュベーション緩衝液)及び8g/lのNaCl及び0.05%ポリソルベート(Tween 20)を含有するpH7.4のリン酸緩衝液(洗浄緩衝液)を使用した。

支持体

厚さ60 μ m、直径24mmの酸化アルミニウム膜。チャネ

ルの直径は0.2 μ m、密度は約18チャネル/ μ m²である(“Anodisc 25”, Whatman)

膜を2 g/lのストレプトアビジンを含有するインキュベーション緩衝液に60分間浸漬することにより膜にストレプトアビジンをコートする。次いで、膜を洗浄緩衝液を用いて洗浄し、室温で風乾する。

第1 結合物質の固定化

WT-断片及びQA-断片に部分的に相補的な2つのオリゴヌクレオチドプローブを適用する。

WT-プローブ: 5' GAATGGGATAGAGTGCATCCAGTG3'
(配列番号3)

Qa-プローブ: 5' GACAGTG TAGATAGATGACAGTCG3'
(配列番号4)

両方とも5'末端にビオチン分子が結合している。

特定の直径を有するスポットを、通常の「細線」筆記用ペン(ドイツのHauser schreibtechnik GmbH)に見られるような多孔質チップ(ナイロンフィーダー)を用いて適用する。フィーダーチップを膜にスポットするが、他端はプローブ溶液(インキュベーション緩衝液、プローブ濃

度25 $\mu\text{mol/L}$)を収容しているリザーバーと流体接触させる。膜とフィーダーとの毛管相互作用によりプローブ溶液の膜への移動をうまく制御する。プローブ溶液は自動的にフィーダーチップと物理的に接触しているチャンネルを満たす。本実施例では、直径0.5 mmの3つのスポットを有する2ラインを使用した(各プローブ型に対して3つのスポット)。各スポット間の距離は1 mmであった。スポットし、室温で10分間インキュベーション後、非結合プローブ材料を洗浄緩衝液を用いて洗い流す。

本実施例では、このようにして4つの同一支持体を製造した。

ハイブリダイゼーション

次に、膜を流動セルに導入し、HIV RNA断片を含有するインキュベーション緩衝液と接触させる。

4つの異なる実験で、4組のハイブリダイゼーション条件を適用した。

1 1. 5×10^{12} 分子のQA RNAを含有する容量25 μl 、流動なし

2 1.5×10^{12} 分子のWT RNAを含有する容量 $25 \mu\text{l}$ 、流動なし

3 1.5×10^{12} 分子のQA RNAを含有する容量 $25 \mu\text{l}$ 、連続流動

4 1.5×10^{12} 分子のWT RNAを含有する容量 $25 \mu\text{l}$ 、連続流動

実験1及び2では、膜を介する緩衝液の移動はない。実験3及び4では、 $25 \mu\text{l}$ のRNA溶液が膜を介して2方向（前後）に約 $25 \mu\text{l}/\text{分}$ の速度で連続的に流れている。この流動を制御するために、自動化Hamiltonディスペンサーを使用した。

すべての実験で、ハイブリダイゼーションは室温で10分間実施した。

洗浄

ハイブリダイゼーション後、膜を洗浄緩衝液 5 ml を用いて洗浄する。

標識化及び検出

検出のために、HIV RNA（配列番号5）に対して包括的なプローブを膜と相互作用させる。このプローブをインキュベーション緩衝液（ 40 nmol/L ）中に含める。各実験で、流動なしで容量 $75 \mu\text{l}$ を使用する。プローブを、マレイミド

含有ヘテロ二官能性架橋剤（Hashida, S. ら, J. Applied Biochem., 56: 56-63 (1984)）を用いて西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）酵素で1:1比で標識する。HRPカップリング前に、プローブをチオール化した（Carlsson J. ら, Biochem J., 173: 723-737 (1978)）。

洗浄緩衝液 10 ml で洗浄後、3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン過酸化水素であるTMB（Organon Teknika, art: 78510）を含有する溶液を膜と接触させる（流動なし）。

結果

結果を裸眼で分析した。実験3及び4では、特異的反応が予測される位置にブルースポットがほぼ直ちに現れる（WTプローブを含有するスポットはWT-RNAを用いてブルーになり、Qaプローブを含有するスポットはQa-RNAを

用いてブルーになる)。緩衝液中にRNAに対して相補的でないプローブを含有するスポットでは、発色は観察されなかった。ただし、数分後にスポット間の膜上の区域が僅かにブルーになったが、これは多分洗浄が十分でないかまたは若干の非特異的結合が生

じたためであろう。実験1及び2でも同様の結果が得られるが、この場合にはブルースポットが目に見えるまで約1分を要する。

TMB反応中スポットを肉眼で評価する以外に、実験3及び4では膜上のスポットをイメージングデンシトメーター(Biorad GS700)を用いて評価した。このために、膜を流動セルから除去した(表1)。

表1: デンシトメーターで測定したスポットの濃度

RNA アナライト	WT-プローブ 含有スポット [OD単位]	Qa-プローブ 含有スポット [OD単位]	バックグラウンド 区域 [OD単位]
WT-RNA	38	20	20
Qa-RNA	25	35	25

実施例2

アルミナとオリゴとの間のリンカーとして3-アミノプロピルトリエトキシラン(APS)を用いて、オリゴヌクレオチドプローブをAnopore膜に共有結合した。実験のために、直径25mm及び総表面積 0.3 m^2 のAnodisc膜25枚を使用した。

膜を硝酸溶液(0.4 mol/L)中に1時間浸漬して膜を活性化した。水ですすいだ後、膜を乾燥し、APSの0.25%

(v/v)水溶液を2時間浸漬した。水ですすぐことにより、過剰のAPSを除去した。減圧下 120°C で乾燥後、膜を保存した。APS分子のカップリングのためにアミノ基濃度は通常 $2\sim 3\text{ }\mu\text{mol/m}^2$ であった。

カップリング前に、アミノ基を末端とするオリゴヌクレオチドをスベリン酸ジスクシンイミジル(DSSN例えばPIERCEBV, Immunotecnology)

logy Catalog & Handbook, 1990参照)と反応させて活性化した。生じたオリゴ端部のスクシイミジル基をAPS活性化膜へのカップリングのために使用した。結果を定量化するために ^{32}P による標識化を使用した。500 μl オリゴ溶液をAnodisc膜へ60分間カップリングさせると、 $1 \times 10^{-10} \text{ mol/m}^2$ のオリゴヌクレオチドのカップリング収率が生じた。

実施例3

Al_2O_3 膜上のアレーパターンのインクジェットデバイスを用いる作成

標準のインクジェット技術を用いて、直径20～80 μm の小滴を生成し、 μm 分解能で高処理量で支持体上に配置することができる。市販のデスクジェット(HP 660C)を Al_2O_3

O_3 膜と組合わせて使用することにより、非常に高い分解能を有するアレーが得られた。顕微鏡(倍率400倍)での肉眼検査で、直径が約60 μm で非常にシャープな縁を有する完全に丸いスポットが見られる。非多孔性表面を用いたときには一般的に観察されるはね散る兆候は観察されなかった。高いアレー解像度は、材料の高い多孔率と貫通チャネルの親水性特性の組合せに帰因する。

実施例4

サンドイッチイムノアッセイの実施

ヒト絨毛性ゴナドトロピン(hCG)の、固相として酸化アルミニウム膜を用いる酵素イムノアッセイでの検出

膜のコーティング

酸化アルミニウム膜の小区域(直径20 mmの円形域)を、hCGに対するモノクローナルマウス抗体(OT-hCG-4B) 1 $\mu\text{g/ml}$ を含有する緩衝溶液(ホスフェート 0.0127 mol/l 及びNaCl 0.140 mol/l , pH 7.4)でコートした。溶液は、膜上に液滴10 μl をピペットで移すかまたはポリエステルフィーダー(Hauser)を用いて接触スポットティングして適用した。37℃で30分間インキュベ

ーション後、膜は使用できるようになる。

インキュベーション

ポジティブサンプルは、濃度2000IU/lのhCG 50 μ l及び西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)(1 μ g/ml)とコンジュゲートしたマウス抗-hCG(OT-hCG-3A)50 μ lの混合物であった。この混合物を15分間プレインキュベートした。ネガティブコントロールの場合、緩衝液50 μ lをコンジュゲート溶液50 μ lと混合した。

次いで、混合物(100 μ l)を膜上にピペットで移し、室温で15分間インキュベートした。

洗浄及び検出

膜を漏斗上で洗浄緩衝液(NaCl 0.131mol/l、ホスフェート0.127mol/l及びポリソルベート200.5ml/l)を用いて徹底的にすすいだ。最後に、膜を、3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジリデン及び過酸化水素を主成分とするHRPに対する基質(Organon Teknika)を収容したビーカーに入れた。30分のインキュベーション中、結果を肉眼及びカメラで観察した。

結果

ポジティブサンプルの場合には、数分以内でOT-hCG-4Bをコートした膜で鮮明なブルースポットが目に見えるようになった。膜の他の部分及びネガティブコントロールの場合には、比較的長いインキュベーション後にほのかなブルーのバックグラウンド色を観察することができた。

【手続補正書】

【提出日】平成12年3月10日(2000.3.10)

【補正内容】

請求の範囲

1. 整列した貫通チャネルを有する支持体を含むアッセイを実施するためのデバイスであって、前記チャネルはサンプル適用表面に開口しており、サンプル適用表面の少なくとも1区域内のチャネルにはアナライトに結合し得る第1結合物質が配設されており、前記支持体は電気化学的に製造された金属酸化物膜であることを特徴とする前記デバイス。
2. 第1結合物質が核酸プローブ、抗体、抗原、レセプター、ハプテン及びレセプターに対するリガンドからなる群から選択されることを特徴とする請求の範囲第1項に記載のデバイス。
3. 第1結合物質が支持体に共有結合していることを特徴とする請求の範囲第1項または第2項に記載のデバイス。
4. 金属酸化物膜が酸化アルミニウムからなることを特徴とする請求の範囲第1項～第3項のいずれかに記載のデバイス。
5. 第1結合物質がその場で合成されることを特徴とする請求の範囲第1項～第4項のいずれかに記載のデバイス。
6. 第1結合物質を合成するための化合物がインクジェット技術を用いて特定区域に適用されることを特徴とする請求の範囲第5項に記載のデバイス。
7. 化合物が静電引力を用いて適用されることを特徴とする請求の範囲第6項に記載のデバイス。
8. 第1結合物質がインクジェット技術を用いて特定区域に適用されることを特徴とする請求の範囲第1項～第4項のいずれかに記載のデバイス。
9. 第1結合物質が静電引力を用いて適用されることを特徴とする請求の範囲第8項に記載のデバイス。
10. 請求の範囲第1項～第4項のいずれかに記載のデバイスの製造における電気化学的に製造した金属酸化物膜の使用。
11. 請求の範囲第1項～第4項のいずれかに記載のデバイスを含むキットで

あって、更に第1結合物質とアナライト間で結合が生じたかどうかを調べるため

の検出手段を含むことを特徴とする前記キット。

12. 検出手段が標識を有する第2結合物質を含むことを特徴とする請求の範囲第11項に記載のキット。

13. 標識が発色反応を生起し得るか及び／またはバイオーもしくは化学ーもしくは光ルミネセンスを生じさせ得ることを特徴とする請求の範囲第12項に記載のキット。

14. サンプル中のアナライトの検出方法であって、

a) サンプルを請求の範囲第1項～第4項のいずれかに記載のデバイスと接触させるステップ、

b) 第1結合物質とアナライトとを結合させるステップ、及び

c) 第1結合物質とアナライトとの間で結合が生じたかを検出するステップを含む前記方法。

15. アナライトが核酸からなることを特徴とする請求の範囲第14項に記載の方法。

16. 核酸がヒト免疫不全ウィルスから誘導され得ることを特徴とする請求の範囲第15項に記載の方法。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 98/04938

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 B01L3/00 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 B01L C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 95 11755 A (HOUSTON ADVANCED RES CENTER ;BEATTIE KENNETH L (US)) 4 May 1995 cited in the application see the whole document	1-16
A	RIGBY WR ET AL: "An anodizing process for the production of inorganic microfiltration membranes" TRANSACTION OF THE INSTITUTE OF METAL FINISHING, vol. 68, no. 3, 1990, pages 95-98, XP000160294 cited in the application see page 95 - page 98	1-4
A	GB 1 432 713 A (CORNING GLASS WORKS) 22 April 1976 see the whole document	1-4

-/--

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 November 1998

Date of mailing of the international search report

08/12/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2250 HW Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Runser, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. (lional) Application No.

PCT/EP 98/04938

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 3 652 761 A (WEETALL HOWARD H) 28 March 1972 see the whole document .	1-4
A	FADDA M B ET AL: "COVALENT COUPLING OF CONCAVALIN A TO COMMERCIAL ALUMINA" BIOTECHNOLOGY AN APPLIED BIOCHEMISTRY, vol. 16, 1992, pages 221-227, XP002050223 cited in the application see page 221 - page 222	1-4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/EP 98/04938

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9511755 A	04-05-1995	AU 1043595 A	22-05-1995
		CA 2174140 A	04-05-1995
		EP 0725682 A	14-08-1996
		JP 9504864 T	13-05-1997
GB 1432713 A	22-04-1976	BE 817434 A	09-01-1975
		DE 2429196 A	06-02-1975
		FR 2236872 A	07-02-1975
		JP 50043090 A	18-04-1975
US 3652761 A	28-03-1972	AT 309675 B	15-07-1973
		BE 755775 A	04-03-1971
		CA 955523 A	01-10-1974
		DE 2042976 A	11-03-1971
		FR 2060904 A	18-06-1971
		GB 1288328 A	06-09-1972
		NL 7013059 A	08-03-1971